

HTLV BLOT 2.4

ENSAYO DE WESTERN BLOT PARA HTLV

Manual de instrucciones

CE
0123

FECHA DE REVISIÓN: 03/10
MAK 0011-SPN-2

Nota: Cambios resaltados.

REF (kit de 18 tests) : 11080-018
(kit de 36 tests) : 11080-036

NOMBRE Y USO PREVISTO

El ensayo **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics (MPD)** es un enzimoinmunoensayo cualitativo para la detección *in vitro* de anticuerpos frente a los virus HTLV-I y HTLV-II en suero o plasma humanos. Su uso previsto es como análisis complementario más específico para las muestras de suero o plasma humanos que presenten reactividad repetida con procedimientos de detección selectiva, como los ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).

INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos recientes llevados a cabo en Estados Unidos y en Europa confirman la prevalencia mixta tanto del HTLV-I como del HTLV-II en distintas poblaciones de alto riesgo, como los consumidores de drogas por vía intravenosa. Actualmente, la disponibilidad de análisis de detección selectiva para HTLV-I/II es considerablemente alta. Las muestras con reactividad repetida en los análisis de detección selectiva requieren otras pruebas más específicas para confirmar la seropositividad para el HTLV-I o para el HTLV-II. Estas pruebas complementarias deben poder identificar los anticuerpos frente a las proteínas centrales *(del core) (gag)* y de la envoltura *(env)* de los virus HTLV-I y HTLV-II. Uno de los análisis complementarios que se utilizan con frecuencia son las tiras de Western-blot que incluyen antígenos víricos naturales del HTLV-I. Sin embargo, dada la ausencia de antígenos naturales de la envoltura en el Western-blot para HTLV-I clásica, suele ser necesario utilizar métodos de radioinmunoprecipitación para confirmar con mayor certeza la presencia de anticuerpos frente al HTLV-I/II. Para distinguir entre las seropositividades para HTLV-I y las seropositividades para HTLV-II, se deben realizar más pruebas (como péptido específico, ELISA o PCR).

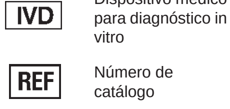
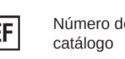
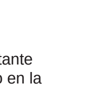
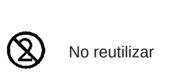
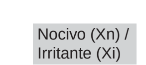
Por tanto, resulta clara la necesidad de disponer de análisis serológicos complementarios sencillos, pero a la vez específicos y sensibles, con los que sea posible obtener una confirmación rápida y, además, diferenciar entre las muestras seropositivas para el HTLV-I y las muestras seropositivas para el HTLV-II.

En el ensayo **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** se han mejorado la sensibilidad y la especificidad tanto para la confirmación como para la diferenciación de las seropositividades para HTLV-I y para HTLV-II. Para ello, hemos incorporado la MTA-1, una proteína recombinante exclusiva de la envoltura del HTLV-I (rgp46-I), la K55, una proteína recombinante exclusiva de la envoltura del HTLV-II (rgp46-II), y la GD21, una proteína recombinante epitópica común pero específica de la envoltura de ambos virus. Cada tira incluye también un control interno de adición de muestras para minimizar el riesgo de falsos negativos debidos a errores operativos.

El ensayo **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** se diseñó como ensayo de anticuerpos complementario para la caracterización de muestras que presenten reactividad repetida con los métodos iniciales de detección de los anticuerpos frente a HTLV-I/II. Los perfiles serológicos posibles con el ensayo **HTLV BLOT 2.4 de MP Diagnostics** son los siguientes: seropositivo para HTLV, seropositivo para HTLV-I, seropositivo para HTLV-II, seronegativo o dudoso.

DESCRIPCIÓN DE LOS SÍMBOLOS

A continuación figuran los símbolos gráficos que aparecen en los envases y productos de **MP Diagnostics**. Estos símbolos son los que se incluyen con más frecuencia en los dispositivos médicos y sus envases. Se explican con mayor detalle en la Norma europea EN 980:2008 y la Norma Internacional ISO 15223-1:2007.

- Usar antes de *Sinónimos:* Fecha de caducidad
-  IVD — Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
- LOT — Código de serie *Sinónimos:* Número de lote Número de serie
-  REF — Número de catálogo
- Límite de temperatura
-  Precaución
-  Fabricante
-  EC REP — Representante autorizado en la Comunidad Europea
- Contenido suficiente para <n> ensayos
-  Consultar las instrucciones de uso
-  No reutilizar
-   Nocivo (Xn) / Irritante (Xi)
- CONT — Indice

PRINCIPIOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL PROCEDIMIENTO

En las tiras de nitrocelulosa se incluyen proteínas víricas del HTLV-I derivadas de partículas víricas naturales modificadas e inactivadas y proteínas desarrolladas mediante ingeniería genética. Las tiras de nitrocelulosa individuales se incuban con muestras de suero o plasma diluidos y controles. Si las muestras contienen anticuerpos frente al HTLV-I/II, dichos anticuerpos se unen a las proteínas del HTLV-I/II de las tiras. Las tiras se lavan para eliminar los productos no unidos, y los anticuerpos que se unen específicamente a las proteínas del HTLV se pueden visualizar mediante una serie de reacciones con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina y el sustrato BCIP/NBT. La sensibilidad de este método es suficiente como para detectar en el suero o el plasma cantidades ínfimas de anticuerpos frente al HTLV.

COMPONENTES DEL KIT

	Descripción del componente	Cantidad suministrada
ANTIGEN STRIPS	**TIRAS DE NITROCELULOSA** Incorporadas con lisado viral de HTLV-I, antígenos recombinantes de envuelta y una banda de control de adición de suero (anti-IgG humana). Manténgalas secas y alejadas de la luz.	Disponible en 18 ó 36 tiras
CONTROL –	**CONTROL NO REACTIVO** Suero humano normal inactivado no reactivo para VHC, VIH-1/2, HTLV-I/II ni HBsAg. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
CONTROL I +	**CONTROL REACTIVO FUERTE I** Suero humano inactivado con una concentración elevada de anticuerpos frente al HTLV-I y no reactivo para VHC, VIH-1/2 ni HBsAg. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
CONTROL II +	**CONTROL REACTIVO FUERTE II** Suero humano inactivado con una concentración elevada de anticuerpos frente a HTLV-II y no reactivo para VHC, VIH-1/2 ni HBsAg. Contiene azida sódica y timerosal como conservantes.	1 vial (80 µl)
BUF LYO. STOCK	**TAMPÓN DE BLOTTING LIOFILIZADO** Para reconstituir con agua de calidad reactivo. Tampón Tris con proteínas animales y no animales termoinactivadas. Contiene timerosal como conservante.	1 ó 2 frascos (cada uno para reconstituir hasta 100 ml)
BUF WASH 20x T	**TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO (20x)** Tris con Tween-20; contiene timerosal como conservante.	1 frasco (70 ml)
CONJUGATE	**CONJUGADO** Anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina.	1 vial (120 µl)
SUBS BCIP / NBT	**SUSTRATO** Solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitroazul de tetrazolio (NBT).	1 frasco (100 ml)
POWDER BLOTTING	**POLVO DE BLOTTING** Leche desnatada	10 paquetes (1 g cada uno)
	Bandejas de incubación de 9 pocillos cada una	2 ó 4 bandejas
	Manual de instrucciones	1 copia
	Pinzas	1 par

Nota: se suministra un volumen de reactivos suficiente para 4 series de análisis.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro* únicamente.
2. Para uso exclusivo por profesionales.
3. Consulte el prospecto del producto para obtener información sobre los componentes potencialmente peligrosos.

INFORMACIÓN SANITARIA Y DE SEGURIDAD

PRECAUCIONES: Este kit contiene productos de origen humano. Ningún método de análisis permite ofrecer una garantía absoluta de que los hemoderivados humanos no transmitan una infección.

MANIPULE LAS MUESTRAS, EL CONTROL REACTIVO FUERTE I, EL CONTROL REACTIVO FUERTE II Y LOS CONTROLES NO REACTIVOS COMO MATERIAL POTENCIALMENTE INFECCIOSO. Se recomienda manipular los componentes del ensayo y las muestras de conformidad con las prácticas correctas de laboratorio. Asimismo, deben desecharse siguiendo los procedimientos de seguridad establecidos.

El ***control reactivo fuerte I, el control reactivo fuerte II*** y el ***control no reactivo*** contienen timerosal y azida sódica; el tampón de reserva concentrado y el tampón de lavado concentrado contienen timerosal; el conjugado contiene azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el cobre y el plomo que se utilizan en ciertas tuberías y formar sales explosivas. Aunque las cantidades que se usan en este kit son pequeñas, los materiales que contienen azida deben eliminarse con volúmenes relativamente grandes de agua para evitar la acumulación de azidas metálicas en las tuberías. A continuación figuran las frases pertinentes relativas a los riesgos (R) correspondientes.

R20/21/22 Nocivo por inhalación, en contacto con la piel y por ingestión

El ***sustrato*** contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y nitroazul de tetrazolio, clasificados como nocivos (Xn) por las directivas de la Comunidad Económica Europea (CEE) que son de aplicación. A continuación figuran las frases pertinentes relativas a riesgos (R).

R20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

1. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales.
2. No pipetee con la boca.
3. Manipule las muestras, las tiras de nitrocelulosa, el control reactivo fuerte I, el control reactivo fuerte II y los controles no reactivos como si fueran potencialmente infecciosos.
4. Use bata de laboratorio y guantes desechables mientras realiza el ensayo. Deseche los guantes en bolsas para residuos biopeligrosos. Lávese bien las manos al finalizar.
5. Es muy aconsejable que este ensayo se lleve a cabo en una cámara de bioseguridad.
6. Mantenga el material alejado de alimentos y bebidas.
7. En caso de accidente o contacto con los ojos, láveselos inmediata y abundantemente con agua y acuda a un médico.
8. Acuda a un médico de inmediato si se ingiere material contaminado o si éste entra en contacto con heridas abiertas u otras lesiones de la piel.
9. Limpie de inmediato los vertidos de material potencialmente infeccioso con papel absorbente y lave la zona contaminada con una solución de hipoclorito sódico al 1% antes de reanudar el trabajo. El hipoclorito sódico no debe utilizarse para vertidos que contengan ácido, a menos que se seque la zona previamente con papel absorbente. Para su eliminación, el material utilizado (incluidos los guantes desechables) debe tratarse como material potencialmente biopeligroso. No utilice el autoclave para el material que contenga hipoclorito sódico.
10. Esterilice en autoclave todos los materiales usados y contaminados a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos antes de desecharlos. Otra opción consiste en descontaminar los materiales con una solución de hipoclorito sódico al 5% durante 30-60 minutos antes de desecharlos en bolsas para residuos biopeligrosos.
11. Descontamine todos los productos químicos y reactivos usados añadiéndoles un volumen de hipoclorito sódico suficiente como para conseguir una concentración final de al menos el 1%. Déjelos apartados durante 30 minutos para lograr una descontaminación eficaz.
12. Se desaconseja la reutilización de las bandejas de incubación.

PRECAUCIONES ANALÍTICAS

1. Para obtener un rendimiento óptimo del ensayo es necesario un **CUMPLIMIENTO ESTRICTO** del procedimiento descrito en este Manual de instrucciones. Cualquier modificación del procedimiento puede provocar resultados anómalos.
2. **NO CAMBIE NI SUSTITUYA LOS REACTIVOS DE UN LOTE DEL KIT POR LOS DE OTRO.** Los controles, el conjugado y las tiras de Western-blot están ajustados para un funcionamiento óptimo. Use sólo los reactivos que se suministran con el kit.
3. No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad que figura en la caja.
4. Evite la contaminación microbiana de los reactivos al abrirlos y al extraer partes alícuotas de los viales o frascos originales, ya que ello reduciría de forma prematura el periodo de validez de los kits y daría lugar a resultados erróneos. Al extraer partes alícuotas de los viales utilice técnicas asépticas, como pipetas o puntas de pipeta desechables.
5. Los controles del kit deben analizarse al mismo tiempo que las muestras clínicas en cada serie de análisis.
6. Para evitar la contaminación cruzada, use una punta de pipeta nueva para cada alícuota de la muestra.
7. Para obtener resultados óptimos, dispense todos los reactivos mientras todavía estén fríos y vuélvalos a guardar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C lo antes posible.
8. Se aconseja lavar el material de vidrio que se vaya a utilizar para los reactivos con ácido clorhídrico 2 M y aclararlo bien con agua destilada o desionizada antes de usarlo.
9. Utilice sólo agua destilada o desionizada de calidad reactivo para diluir los reactivos.
10. Todos los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso.
11. La solución del conjugado de trabajo, el tampón de lavado diluido y el tampón de blotting **deben estar recién preparados.**
12. La solución del conjugado de trabajo debe prepararse en un recipiente o vaso de precipitado de polipropileno.
13. No exponga los reactivos ni realice el análisis en un área en la que exista un nivel elevado de vapores de desinfectantes químicos (p. ej., vapores de hipoclorito) durante las etapas de almacenamiento y de incubación: el contacto inhibe la reacción de color. Los reactivos tampoco deben exponerse a la luz intensa.
14. Es preferible efectuar el ensayo a temperatura ambiente (25 °C ± 3 °C).
15. Asegúrese de colocar las tiras con los números hacia arriba.
16. En los ensayos de Western-blot es importante utilizar un agitador con plato basculante; el uso de un agitador rotativo podría poner en peligro el rendimiento del kit. La velocidad de agitación y el ángulo de inclinación recomendados son, respectivamente, de 12 a 16 ciclos por minuto y de 5 a 10 grados.
17. Si se utiliza equipo automatizado, debe verificarse que se ha validado antes de su uso.
18. Asegúrese de añadir las muestras sin que toquen la tira. Para ello, puede inclinar la bandeja y añadir la muestra en la parte baja donde se acumula el tampón. De este modo, se evitará la formación de puntos negros debidos a la adición de muestra a la tira.
19. No utilice congeladores con función de descongelación automática para conservar los reactivos y las muestras.

CONSERVACIÓN

1. Conserve el kit HTLV BLOT 2.4 de MPD y sus componentes a 2 °C - 8 °C cuando no se estén utilizando.
2. Todos los reactivos y tiras de análisis, conservados a una temperatura de entre 2 °C a 8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad que figura en el kit. No congele los reactivos.

A. **Tiras de antígenos**
   - Evite las exposiciones innecesarias de las tiras de antígenos a la luz.

B. **Reactivos**
   - Conserve los reactivos en sus viales o frascos originales, que deberán estar tapados.
   - Dispense todos los reactivos cuando aún estén fríos y vuélvalos a guardar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C lo antes posible.
   - Cuando el sustrato se conserva en un intervalo de 2 °C a 8 °C puede precipitar, sin que ello afecte al funcionamiento del kit.

PRECAUCIÓN: Evite las exposiciones innecesarias del sustrato a la luz.

RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se pueden utilizar muestras de suero o plasma con EDTA, heparina o citrato sódico. Antes de guardar las muestras, verifique que se hayan separado por centrifugación los coágulos o las células sanguíneas.

Las muestras deben conservarse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C si el análisis se va a llevar a cabo en los 7 días posteriores a la extracción, o congelarse a una temperatura de al menos -20 °C si el análisis se va a retrasar más de 7 días. Es preferible utilizar muestras transparentes y no hemolizadas. Las muestras muy lipémicas, ictéricas o contaminadas (por partículas) deben filtrarse (0,45 µm) o centrifugarse antes del ensayo.

Las muestras pueden estar inactivadas, pero esto no es un requisito para el rendimiento óptimo del análisis.

Para llevar a cabo la inactivación proceda como se explica a continuación:
1. Afloje la tapa del recipiente que contiene la muestra.
2. Desactive la muestra calentándola a 56°C durante 30 minutos al baño María.
3. Deje enfriar la muestra antes de volver a ajustar la tapa.
4. La muestra puede conservarse congelada hasta el análisis.

Se recomienda no someter la muestra a ciclos repetidos de congelación y descongelación.

MATERIAL ADICIONAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Agua destilada o desionizada.
- Guantes desechables.
- Plato basculante (con velocidad de balanceo de entre 12 y 16 oscilaciones por minuto e inclinación de 5° - 10° para lavar las membranas uniformemente).
- Pipetas y puntas del volumen adecuado.
- Aspirador con depósito de hipoclorito sódico.
- Baño María a 56 °C (optativo).
- Hipoclorito sódico para la descontaminación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO
   (a) El TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO **debe estar recién preparado.**
   (b) Diluya 1 volumen de TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO (20X) con 19 volúmenes de agua de calidad reactivo. Mezcle bien.

2. TAMPÓN DE BLOTTING
   (a) Reconstituya cada frasco de TAMPÓN DE BLOTTING LIOFILIZADO con 100 ml de agua de calidad reactivo. Mezcle bien para que se disuelva. Este TAMPÓN DE BLOTTING RECONSTITUIDO es estable durante 6 semanas si se conserva a 2 °C - 8 °C.
   (b) El TAMPÓN DE BLOTTING **debe estar recién preparado.** Añada 1 g de POLVO DE BLOTTING por cada 20 ml del TAMPÓN DE BLOTTING RECONSTITUIDO preparado en el paso anterior (2 a). Agite hasta que el polvo se disuelva por completo.
   (c) Agite de nuevo antes de dispensar la mezcla.

3. SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO
   Nota: prepare la solución en un recipiente o vaso de precipitado de polipropileno.
   (a) LA SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO **debe estar recién preparada.**
   (b) Prepare la SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO diluyendo CONJUGADO en TAMPÓN DE BLOTTING en proporción de 1:1000; p. ej., 10 µl de CONJUGADO en 10 ml de TAMPÓN DE BLOTTING.

4. SOLUCIÓN SUSTRATO (lista para su uso)
   (a) Dispense el volumen necesario directamente del frasco. Use una pipeta limpia. Cierre bien el frasco después de usarlo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Notas: a) Aspire todos los productos químicos y reactivos utilizados con un aspirador provisto de depósito con hipoclorito sódico.

b) Todas las incubaciones deben efectuarse en un plato basculante.

PRECAUCIONES:

Algunas muestras pueden causar manchas oscuras en el punto de la tira en el que se añadieron. Para evitar este problema, proceda de la forma siguiente:

i. Añada siempre la muestra después de haber dispensado el TAMPÓN DE BLOTTING.

ii. Incline ligeramente la bandeja elevando su extremo superior o su fondo. El tampón de BLOTTING se desplazará hacia la zona más baja de la bandeja. Añada la muestra en la zona en la que se haya acumulado el tampón de BLOTTING. Cuando haya dispensado todas las muestras, devuelva la bandeja a su posición horizontal inicial. Asegúrese siempre de que las tiras se mantengan húmedas durante el proceso.

iii. Otra opción, si no desea inclinar la bandeja, es dispensar las muestras en el extremo superior o en el fondo del pocillo. De esta forma, si aparecen manchas oscuras, la lectura de los resultados de la tira no se verá afectada.

Procedimiento:

1. Utilizando unas pinzas y con sumo cuidado, extraiga del tubo la cantidad de TIRAS necesaria y coloque cada tira en su pocillo con el número hacia arriba. Incluya tiras para los controles reactivo fuerte, reactivo débil y no reactivo.
2. Añada 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO a cada pocillo. **2 ml**
3. Incube las tiras durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en un plato basculante (velocidad 10 - 14 oscilaciones por minuto). Extraiga el tampón por aspiración. **5 minutos**
4. Añada 2 ml de TAMPÓN DE BLOTTING a cada pocillo. **2 ml**
5. Añada 20 µl de suero de los pacientes o de controles, según corresponda, en cada uno de los pocillos. **20 µl**
6. Cubra la bandeja con la tapa suministrada e incube durante 1 hora a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en el plato basculante. **60 minutos**
7. Destape la bandeja con cuidado para evitar salpicaduras y el mezclado de las muestras. Incline la bandeja para aspirar la mezcla de los pocillos. Cambie las puntas del aspirador entre muestras para evitar la contaminación cruzada.
8. Lave 3 veces cada tira con 2 ml de TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO, dejando que se empapen durante 5 minutos en el plato basculante entre los lavados. **3 x 2 ml**
9. Añada 2 ml de SOLUCIÓN DEL CONJUGADO DE TRABAJO a cada pocillo. **2 ml**
10. Cubra la bandeja e incube durante 1 hora a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) en el plato basculante. **60 minutos**
11. Aspire el CONJUGADO de los pocillos. Lave como en el paso 8. **3 x 2 ml**
12. Añada 2 ml de SOLUCIÓN SUSTRATO a cada pocillo. **2 ml**
13. Cubra la bandeja e incube durante 15 minutos en el plato basculante. **15 minutos**
14. Aspire el SUSTRATO y aclare las tiras un mínimo de tres veces con agua de calidad reactivo para detener la reacción. **3 x 2 ml**
15. Con unas pinzas, extraiga con cuidado las tiras y colóquelas sobre paños de papel. Cúbralas con paños de papel y séquelas. Otra posibilidad es dejar que las tiras se sequen en los pocillos de la bandeja.
16. Coloque las tiras en una hoja de trabajo (papel blanco no absorbente). No aplique cinta adhesiva sobre las bandas reveladas. Observe las bandas (véase Interpretación de los resultados) y califique los resultados. Para el almacenamiento, mantenga las tiras en la oscuridad.

RESUMEN DE LOS PROTOCOLOS DE ENSAYO

Reactivos	Cant.	Duración
Tira de nitrocelulosa	1	-
Tampón de lavado	2 ml	5 min
Tampón de blotting	2 ml	-
Muestra	20 µl	60 min
Tampón de lavado	3 x 2 ml	3 x 5 min
Conjugado	2 ml	60 min
Tampón de lavado	3 x 2 ml	3 x 5 min
Sustrato (listo para su uso)	2 ml	15 min
Agua destilada	3 x 2 ml	-

CANTIDADES DE REACTIVOS NECESARIAS PARA DIVERSOS NÚMEROS DE TIRAS

Reactivos	NÚMERO DE TIRAS						
	3	6	9	15	20	27	36
Tampón de lavado 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Tampón de blotting 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugado (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Sustrato (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Polvo de blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTROL DE CALIDAD

Es aconsejable realizar en todos los ensayos el control no reactivo y los dos controles reactivos fuertes, independientemente del número de muestras que se analicen. Para que los resultados obtenidos en cualquier ensayo se consideren válidos se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. CONTROL NO REACTIVO
No deben observarse bandas víricas específicas de HTLV-I/II, rgp46-I, rgp46-II ni GD21 en la tira de control no reactivo. La banda del control de suero (anticuerpos anti-IgG humana) debe ser visible.

2. CONTROL REACTIVO FUERTE I
La banda del control de suero y todas las bandas relevantes del peso molecular del HTLV-I/II deben ser evidentes. Las bandas relevantes del HTLV-I que deben estar presentes son p19, p24, gp46, rgp46-I y GD21. Tenga en cuenta que la banda de la gp46 está esparcida.

3. CONTROL REACTIVO FUERTE II
La banda del control de suero y todas las bandas relevantes del peso molecular del HTLV-I/II deben ser evidentes. Las bandas relevantes del HTLV que deben estar presentes son p24, GD21 y rgp46-II.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La banda del control de suero sirve para comprobar que se ha añadido el suero al análisis. La ausencia de esta banda indica que no se han dispensado en la tira del ensayo el suero del análisis, el conjugado o el sustrato, o bien algún otro error operativo.

Localice e identifique las bandas de las tiras analizadas con los controles reactivos fuertes. Dichas tiras se usan para identificar las bandas presentes en las tiras utilizadas con las muestras del ensayo.

PATRÓN	INTERPRETACIÓN
1. Sin reactividad a las proteínas específicas del HTLV	SERONEGATIVA
2. Reactividad a GAG (p19 con o sin p24) y dos ENV (GD21 y rgp46-I)	SEROPOSITIVA para HTLV-I
3. Reactividad a GAG (p24 con o sin p19) y dos ENV (GD21 y rgp46-II)	SEROPOSITIVA para HTLV-II
4. Reactividad a GAG (p19 y p24) y ENV (GD21) - *indica SEROPOSITIVIDAD para HTLV-I si p19 ≥ p24* - *indica SEROPOSITIVIDAD para HTLV-II si p19 < p24*	SEROPOSITIVA para HTLV*
5. Se detectan bandas específicas de HTLV, pero el patrón no cumple los criterios de seropositividad para HTLV-I, HTLV-II ni HTLV. Sin embargo, deben interpretarse como SERONEGATIVAS las muestras con los siguientes patrones de bandas dudosos: - *Patrones dudosos del GAG del HTLV-I (HGIP, HTLV-I GAG indeterminate patterns) de Western-blot. Presencia de p19, p26, p28, p32, p36, p53, pero ausencia de p24 y de todas las proteínas ENV* - *Cualquier combinación de proteínas GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53), pero ausencia de p24 y de todas las proteínas ENV* - *Cualquier proteína GAG sola (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53)*	DUDOSA**

* En ausencia de rgp46-I y rgp46-II, se puede usar el algoritmo de *Wiktor y cols.* para las muestras seropositivas para HTLV que no se puedan tipificar. Este algoritmo, que utiliza la reactividad relativa a p19 y p24, ha demostrado ser eficaz para diferenciar entre los dos serotipos[7,11,12,13,14].

** La interpretación de una muestra como dudosa se basa en las directrices de 1990 de la OMS[15]. Sin embargo, diversos estudios han indicado que ciertos patrones de bandas dudosos (los ya mencionados) se pueden interpretar como seronegativos, sobre todo en el caso de donantes de sangre sanos[16-25]. Por ejemplo, un estudio en el que participaron 37.724 donantes de sangre sanos, confirmó que era seguro interpretar los HGIP como seronegativos[26]. No obstante, resulta necesario extremar las precauciones cuando se obtengan patrones dudosos en muestras procedentes de consumidores de drogas por vía intravenosa, donantes de sangre de zonas endémicas o pacientes con enfermedades neurológicas[26,27].

Aunque no es frecuente, puede haber muestras de suero con infección doble, que también pueden diferenciarse con los criterios antes citados. Los patrones de bandas de tales muestras indicarán seropositividad para HTLV-I y para HTLV-II. Los datos disponibles demuestran que las serorreactividades para rgp46-I y rgp46-II son específicas, respectivamente, de HTLV-I y de HTLV-II, por lo que los sueros reactivos a rgp46-I, rgp46-II, GD21, p19 y p24 se clasificarán como muestras con infección doble.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

Para obtener un rendimiento óptimo del ensayo es necesario un cumplimiento estricto del procedimiento descrito; cualquier modificación puede provocar resultados anómalos.

Un resultado NEGATIVO no excluye la posibilidad de exposición a los virus ni de infección por HTLV-I o HTLV-II. Las tiras con resultado DUDOSAS no deben utilizarse como base para el diagnóstico de infección por HTLV-I/II.

Se han notificado casos de serorreactividad para p19 o p24 en individuos no infectados de poblaciones de bajo riesgo, si bien los resultados dudosos de p24 son relativamente poco frecuentes.

Se ha informado de una sensibilidad del 95% para la rpg46-I en Francia, siendo del 100% para las muestras confirmadas por PCR en Jamaica y Estados Unidos y del 98% de los donantes de sangre seropositivos para HTLV-I. Se ha demostrado que la sensibilidad a rgp46-II es superior al 98% en las muestras confirmadas por PCR procedentes de Estados Unidos.

Se calcula que la sensibilidad global de los dos tipos, rgp46-I y rgp46-II, es mayor del 97%. El pequeño porcentaje de muestras con HTLV-I y HTLV-II que resultan no reactivas con rgp46-I o rgp46-II son reactivas como mínimo a GD21 y a una o más bandas de GAG, p19 o p24, con lo cual cumplen los criterios de seropositiva para HTLV (patrón 4) o de dudosa (patrón 5). No se notificó ninguna interpretación de falso negativo.

Las pruebas complementarias como la PCR (para HTLV-I y HTLV-II) pueden ser útiles para distinguir las muestras seropositivas para HTLV que no se pueden identificar como HTLV-I ni como HTLV-II con el ensayo HTLV BLOT 2.4 de MPD (es decir, el patrón 4).

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL FUNCIONAMIENTO

El funcionamiento del kit HTLV BLOT 2.4 de MPD para la detección de anticuerpos frente a HTLV-I y HTLV-II se evaluó utilizando muestras seropositivas y seronegativas para HTLV-I/II y se comparó con dos inmunoensayos en línea que incorporan antígenos de HTLV I y HTLV II (péptidos o proteínas recombinantes).

Sensibilidad

Especimenes positivos para anticuerpos frente a HTLV I o/y HTLV II por tests de ELISA comerciales se utilizaron para determinar la sensibilidad del HTLV BLOT 2.4 de MPD.

A. Comparación con el inmunoensayo en línea 1
Los resultados del Blot para muestras positivas compradas de Boston Biomedica, Inc., USA (BBI), y ProMedDx comparando el HTLV BLOT 2.4 de MPD y el inmunoensayo en línea 1 (LI 1) fueron los siguientes:

Método		Inmunoensayo en línea 1		Total
		NEG / IND	POS	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	NEG / IND	3*	0	3
	POS	0	102	102
	Total	3	102	105

* El HTLV BLOT 2.4 de MPD presentó 2 resultados indeterminados y 1 resultado negativo que también se detectó como negativo con el inmunoensayo en línea 1. El inmunoensayo en línea 1 presentó 3 resultados negativos.

Los dos Blots presentaron las siguientes discriminaciones para las 102 muestras positivas de HTLV:

Método	Interpretación				Total
	HTLV I	HTLV II	HTLV I & HTLV II**	No-tipable***	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	45	53	4	0	102
LI 1	48	51	0	3	102

** Marcadores específicos tanto de HTLV I como de HTLV II han aparecido, lo que indica co-infección.
*** No es posible clasificar el tipo de HTLV debido a la ausencia de marcadores específicos.

Los resultados obtenidos con el HTLV BLOT 2.4 de MPD y con el LI 1 fueron similares. Los pocos resultados discordantes se deben a diferentes antígenos inmovilizados en los blots y a los diferentes métodos utilizados.

El kit HTLV BLOT 2.4 de MPD demostró una sensibilidad del 97,1%, equivalente a la obtenida con el inmunoensayo en línea 1.

B. Comparación con el inmunoensayo en línea 2
Se evaluó el panel de anti-HTLV-I y anti-HTLV-II de la Sociedad Francesa de Transfusión Sanguínea, SFTS-94, que consiste en 26 muestras de HTLV-I y 6 muestras de HTLV-II. Los resultados del HTLV BLOT 2.4 de MPD con este panel fueron comparados con los del inmunoensayo en línea 2 (LI 2) como sigue:

Método	Interpretación				Total
	HTLV I	HTLV II	No-tipable	Falso NEG	
HTLV BLOT 2.4 de MPD	26	6	0	0	32
LI 2	21	6	4	1	32

El HTLV BLOT 2.4 de MPD identifica correctamente las muestras positivas de HTLV, dando una sensibilidad >99,9% con este panel. Con el kit de comparación (LI 2) la sensibilidad obtenida fue del 96,9%.

Especificidad

Un total de 200 muestras de donantes de sangre fueron probadas resultando en una especificidad del 92,5%. 15 muestras fueron indeterminadas y no hubo resultados positivos falsos.

Si se incluyen 150 muestras clínicas, 50 muestras de embarazadas, 50 potencialmente interferentes (10 de cada: ictéricas, hemolizadas, triglicéridos, lipémicas, proteínas totales), y 73 muestras con riesgo potencial de reacción cruzada (TB, *Helicobactor pylori*, HEV, Dengue, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2), la especificidad global fue del 89,2% (461/517). 56 muestras fueron indeterminadas y no hubo resultados positivos falsos. 6 muestras fueron positivas confirmadas como verdaderas con otro test confirmatorio.

CLÁUSULA DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

El fabricante garantiza exclusivamente que el kit de análisis funcionará como ensayo diagnóstico *in-vitro,* de acuerdo con las especificaciones y limitaciones descritas en el Manual de instrucciones del producto, cuando se use de conformidad con las instrucciones citadas en el mismo. El fabricante rehúsa cualquier garantía, expresa o implícita, incluida la garantía expresa o implícita relativa a la comercialización, adecuación para el uso o supuesta utilidad para cualquier otro fin. El fabricante sólo se obliga a la sustitución del producto o al reembolso del precio de compra del mismo. El fabricante no será responsable ante el comprador ni ante terceros de cualesquiera daños, perjuicios o pérdidas económicas provocados por la utilización o la aplicación del producto.

PROBLEMAS TÉCNICOS Y RECLAMACIONES

En caso de problemas técnicos o si desea presentar una reclamación, proceda de la siguiente manera:
1. Anote el número de lote del kit y su fecha de caducidad.
2. Conserve los kits y los resultados obtenidos.
3. Póngase en contacto con la oficina de MP Biomedicals más cercana o con su distribuidor local.

BIBLIOGRAFÍA

1. Towbin H., Staehlin T. and Gordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976; 76: 4350-4354.

2. Poiesz BJ., Ruscetti FW., Gazdar AF., Bonn PA., Minna JD. And Gallo RC. Detection and Isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1980; 77(12): 7415-7419.

3. Kalyanaraman VS., Sarngadharan MG., Robert-Guroff M., Miyoshi I., Blayney D., Golde and Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science 1982; 218: 571-573,

4. William AE., Fang CT., Slamon DJ. et al. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. Science 1988; 240: 643-646,

5. Lee H., Swanson P., Shorty VS., Zack JA., Roseblatt JD. and Chen ISY. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. Science 1989; 244: 471-475,

6. Lipka JJ., Bui K., Reyes GR, Moeckli R., Wiktor SZ., Blattner WA., Murphy EL., Hanson CV., Shaw GM., Shinsky JJ. and Foung SKH. Determination of a unique immunodominant epitope of HTLV-I. Infect Dis 1990; 162: 353-357

7. Wiktor SZ., Alexandra SS., Shaw GM. et al. Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western Blot. Lancet 1990; 335: 1533.

8. Samuel KP., Lautenberger JA., Jorcyk CL., Josephs S., Wong Staal F. and Papas TS. Diagnostic potential for human malignancies of bacterially produced HTLV-I envelope protein. Science 1984; 226: 1094-1097.

9. Hadlock KG., Goh CJ., Bradshaw PA., Perkins S., Lo J., Habbaz RK., Kaplan J. and Foung SKH. Delineation of an immunodominant and highly HTLV specific epitope within the HTLV-I transmembrane glycoprotein. Blood 1995; 68(4): 1392-1399.

10. Varma M., Rudolph D., Knuchel M., Switzer W., Hadlock KG., Velligan M., Chan L., Foung SKH., Lal RB. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of HTLV-I and HTLV-II infection by Western Blot assay containing recombinant envelope glycoproteins. J. Clin. Micro. 1995; 33(12): 3239-3244.

11. Lillehoj EP., Alexander SS., Dubrule CJ., Wiktor S., Adams R., Thi, A. Manns CC., and Blattner WA. Development and evaluation of a human T-Cell leukemia virus type I serologic confirmatory assay incorporating a recombinant envelope polypeptide. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 2653-2658.

12. Lal RB., Brodine SK., Coligan JE., and Roberts CR. Differential antibody responsiveness to p19 gag results in serological discrimination between human T-lymphotropic virus type I and type II. J. Med. Virol. 1991; 1: 232-236,

13. Hjelle B., Cyrus S., Swenson S., and Mills R. Serologic distinction between human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and HTLV type II. Transfusion 1991; 31: 731-736,

14. Madeleine, MM., Wiktor SZ., Goedert JI., Manns A., Levine PH., Biggar RJ., Blattner WA. HTLV-I and HTLV-II worldwide distribution: reanalysis of 4.832 immunoblot results. Inte. J. Cancer 1993.; 54(2): 255-260,

15. World Health Organization's Global Programme on AIDS. WHO Global Programme on AIDS Information Update. Virus Information Exchange Newsletter 1990; 7(2): 54-55.

16. Lal, RB., Rudolph DL., Coligan JE., Brodine SK., and Roberts CR. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and type II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV-I/II. Blood 1992; 80: 544-550,

17. Khabbaz, RF., Heneine W., Grindon A., Hartley TM., Shulman G., and Kaplan J. Indeterminate HTLV serologic results in U.S. blood donors: Are they due o HTLV-I or HTLV-II? J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1992; 5: 400-404,

18. Lipka, JJ., Young KK., Kwok SY., Reyes GR., Sninsky JJ, and Foung SK. Significance of human T-lymphotropic virus type I indeterminant serological findings among healthy individuals. Vox Sang. 1991; 61: 171-176,

19. Zrein M., Louwagie J., Boeykens H., Govers L., Hendickx G., Bosman F., Sablon E., Demarquilly C., Boniface M., and Saman E. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. Clin. Diag. Lab. Immunol. 1998; 5: 45-49.

20. Witt DJ., Kuramoto K., Kemper M., and Holland P. Utility of prospective study of donors deferred as HTLV indeterminate. Vox Sang. 2000; 78:130-131,

21. Hayes C.G., Burans JP., and Oberst RB. Antibodies to Human T Lymphotropic virus Type I in a population from the Philippines: Evidence for cross-reactivity with *Plasmodiun falciparum.* The J. Infect. Dis. 1990; 163: 257-262,

22. Gallo D., Diggs JL., and Hanson CV. Evaluation of two commercial Human T-Cell Lymphotropic Virus Western blot (Immunoblot) kits with problem specimens. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2046-2049.

23. Garin B., Gosselin S., de The G., and Gessain A. HTLV-I/II infection in a high viral endemic area of Zaire, Central Africa: Comparative evaluation of serology, PCR, and significance of indeterminate Western blot pattern. J. Med. Virol. 1994; 44: 104-109,

24. Fujiyama C., Fujiyoshi T., Matsumoto D., Yashiki S., Tamashiro H., and Sonoda S. Re-evaluation of anti-HTLV-I Western blot assay using HTLV-I and HTLV-II serum panels. Clin. & Diag. Virol. 1995; 4: 149-161,

25. Rouet F., Meertens L., Courouble G., Herrmann-Storck C., Pabingui R., Chancerel B., Abid A., Strobel M., Mauclere P., and Gessain A. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type I - seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. J. Clin. Microbiol. 2001; 39: 1247-1253

26. Cesaire R., Bera O., Maier H., Lezin A., Martial J., Ouka M., Kerob-Bauchet B., Ould Amar AK., and Vernant JC. Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. Transfusion 1999; 39: 1145-1149.

27. Soldan SS., Graf MD., Waziri A., Flerlage AN., Robinson SM., Kawaninshi T, Leist TP., Lehky TJ., Levin MC., and Jacobson S. HTLV-I/II seroindeterminate western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. J. Infect. Dis. 1999; 180: 685-694,



MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
2 Pioneer Place
Singapore 627885

Tel.: + 65 6775 0008
Fax: + 65 6774 6146
Correo electrónico: enquiry_ap@mpbio.com

EC REP
Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Alemania
Tel.: + 49 68 94 58 1020
Fax: + 49 68 94 58 1021
Correo electrónico: info@mt-procons.com

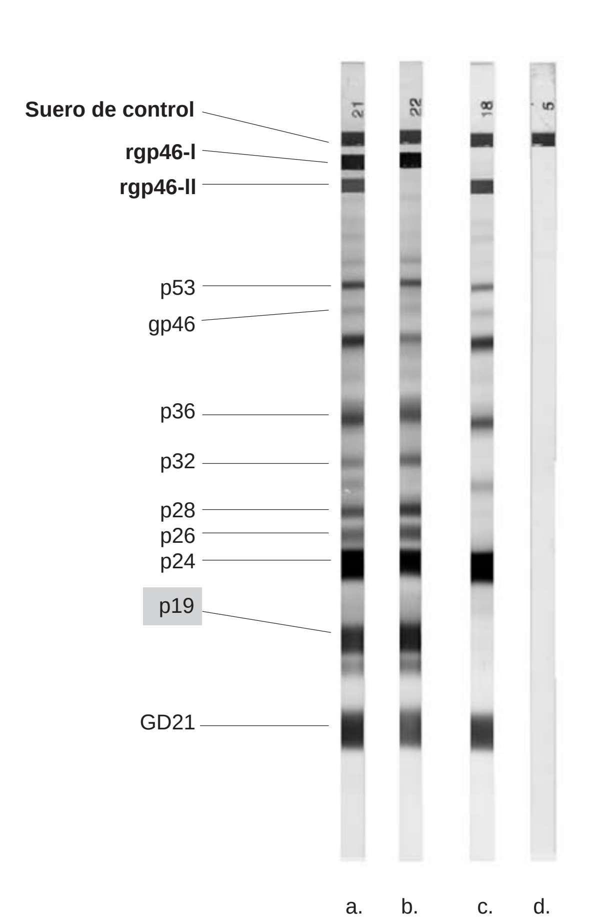
Oficinas regionales:

MP Biomedicals SAS
Parc d'Innovation, BP 50067
67402 Illkirch Cedex
France

Tel. : +33 388 67 4607
Fax : +33 388 67 5420
Correo electrónico: custserv.eur@mpbio.com

* Patente en EE. UU.	5.066.579 ; 5.614.366 ; 5.763.572 ; 5.814.441 ; 5.871.933 ; 5.643.714
* Patente en Australia:	613350 ; 667189 ; 690540
* Patente en Canadá:	1337799
* Patente en Europa:	0395634
* Patente en Japón:	2559482

FIGURA 1



Bandas víricas específicas tal y como se ven con:
a. Un suero con infección doble HTLV-I/II
b. Control reactivo fuerte I (reactivo sólo para el HTLV-I)
c. Control reactivo fuerte II (reactivo sólo para el HTLV-II)
d. Control no reactivo